

Documentos

ISSN 0102-0110
Junho, 2007

228



**PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS DE EXTRATOS VEGETAIS DO
BIOMA CERRADO PARA O CONTROLE DE *Colletotrichum
gossypii* var. *cephalosporioides* e *Meloidogyne
incognita***

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos 228

PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS DE EXTRATOS VEGETAIS DO BIOMA CERRADO PARA O CONTROLE DE *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Meloidogyne incognita*

Thales Lima Rocha

Aline Melro Murad

Laila Salmen Espindola

Alexandre Augusto P. Firmino

Osmundo Brilhante de O. Neto

Marise Ventura Coutinho

Maria Cristina Mattar da Silva

Maria de Fátima Grossi de Sá

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final)

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

www.cenargen.embrapa.br

e.mail: sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros:

Arthur da Silva Mariante

Maria Iara Pereira Machado

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Daniele Alves de Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

P 966 Prospecção de moléculas de extratos vegetais do bioma cerrado para o controle de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Meloidogyne incognita* / Thales Lima Rocha [et al.] ... -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
25 p. -- (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102 - 0110; 228).

Agronegócio brasileiro. 2. *Colletotrichum gossypii* - *cephalosporioides*. 3. *Meloidogyne incognita*. 4. Metabólitos secundário. 5. Peptídeos antifúngicos. 6. Extratos Vegetais. I. Rocha, Thales Lima. II. Série.

632.96 - CDD 21.

Autores

Thales Lima Rocha

Pesquisador, PhD.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Aline Melro Murad

Bolsista - CNPq

Laila Salmen Espindola

Pesquisadora, PhD.

Universidade de Brasília

Alexandre Augusto P. Firmino

Doutorando

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Osmundo Brilhante de O. Neto

Bolsista - CNPq

Marise Ventura Coutinho

Pesquisadora, MSc.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Maria Cristina Mattar da Silva

Pesquisadora, PhD

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Maria de Fátima Grossi de Sá

Pesquisadora, PhD.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

SEGURANÇA BIOLÓGICA PARA A LAVOURA

ARROZEIRA NO BRASIL

Thales Lima Rocha
Aline Melro Murad
Laila Salmen Espindola
Alexandre Augusto P. Firmino
Osmundo Brilhante de O. Neto
Marise Ventura Coutinho
Maria Cristina Mattar da Silva
Maria de Fátima Grossi de Sá

RESUMO

Atualmente, o agronegócio brasileiro é responsável por 34% do Produto Interno Bruto (PIB), e vem demonstrando a sua importância para o país, proporcionando empregos, renda e desenvolvimento. O modelo agrícola desenvolvido na região do Cerrado utiliza-se de muitos insumos agrícolas, sobretudo os agrotóxicos para controle de fitoparasitas. Grandes prejuízos na produção, especialmente nas culturas de alto valor econômico, são ocasionados pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e por fitonematóides do gênero *Meloidogyne* spp. Para ambos, o controle é dependente de químicos sintéticos os quais causam muitos impactos negativos. Por conseguinte, pesquisas que busquem métodos de controle que sejam menos danosos ecologicamente são fundamentais. Estudos demonstraram que plantas são fontes de compostos com propriedades antifúngicas e nematicidas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi prospectar extratos vegetais das espécies *Guarea kunthiana* A. Juss e *Guarea guidonea* (L) Sleumer da família Meliaceae, ativos sobre *C. gossypii* e *M. incognita* a partir do banco de extratos da Universidade de Brasília (UnB). Para tanto, extratos de várias partes de ambas as espécies foram solubilizados em DMSO 100%. A extração de ovos de *M. incognita* foi realizada segundo a metodologia de Hussey e Barker, os juvenis de segundo estágio (J_2) foram obtidos por meio da técnica de funil de Baermann modificada e a contagem foi processada em lâminas de Peters e microscópio óptico. Os bioensaios para *C. gossypii* foram conduzidos em duplicata usando alíquotas contendo $200\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ tendo como controle negativo DMSO 100% e positivo Nistatina 2000UI. Bioensaios para *M. incognita* foram realizados também em duplicata utilizando alíquotas de 1mg e suspensões aquosas de $100 J_2.\text{mL}^{-1}$ em placas de Petri, tendo como controle negativo DMSO 1,5% e positivo água destilada. A partir da triagem de quinze extratos, foi identificado um com efeito nematostático sobre J_2 , sendo este oriundo de caule da espécie *G. kunthiana*. Nenhum extrato demonstrou atividade sobre *C. gossypii*. Futuramente, novas triagens serão feitas para averiguar os efeitos dos extratos sobre *M. incognita* e *C. gossypii* objetivando a continuidade da construção do banco de extratos defensivos agrícolas no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP).

Palavras chave: Agronegócio brasileiro *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* *Meloidogyne incongita* Metabólitos Secundário Peptídeos antifúngicos Extratos Vegetais

ABSTRACT

Nowadays, Brazilian Agribusiness is responsible for 34% of the Gross Domestic Product (GDP) and is showing its importance for the country, providing jobs, income and development. The agricultural model developed in Brazilian Savannah make use of many agricultural drawbacks, mainly pesticides for phytoparasites control. Extensive losses of production, over all in cultures that have a high economic value, are caused by Fungi *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* and for root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne*. For both, the control is dependent on synthetic chemicals, which cause negative impacts. Research projects searching for less ecologically damaging control methods, are essential. Phytochemical studies have shown that plants are sources of compounds with antifungal and nematicides properties. In this context the aim of this work was to prospect vegetal extracts from *Guarea kunthiana* A. Juss and *Guarea guidonea* (L) Sleumer species of Meliaceae family from Universidade de Brasília's (UnB) bank extracts active against *C. gossypii* and *M. incognita*. Therefore, extracts of many parts of plants were resuspended using 100% DMSO. The egg extraction of *M. incognita* was performed using 0.5% sodium hypochlorite according Hussey & Barker, the second stadium juveniles (J₂) were submitted to the modified Baermann's technique and the counting was performed using Peters' slide and optical microscope. The bioassays with *C. gossypii* were carried out in duplicate using 200µg.µL⁻¹ aliquots having as negative control 100% DMSO and positive control 2000UI Nistatina. Bioassays for *M. incognita* were also carried out in duplicate using 1mg aliquots and aqueous suspensions of 100 J2.mL⁻¹ in Petri dishes, having as negative control 1.5% DMSO and positive control distilled water. From the selection of fifteen extracts, one with nematostatic activity was identified, being this one from steam of *G. kunthiana* specie. No extract has shown activity against *C. gossypii*. In the future, new selections will be made to investigate activities against *M. incognita* and *C. gossypii* aiming the continuity of construction of the defensive substances' bank in Plant-Pathogen Molecular Interaction Laboratory (LIMPP).

Keywords: Brazilian Agribusiness *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* *Meloidogyne incognita* Secondary Metabolites Antifungal peptides Vegetal Extracts

INTRODUÇÃO

Atualmente, o agronegócio brasileiro é responsável por 34% do Produto Interno Bruto (PIB) e vem mostrando a sua importância para o Brasil, proporcionando cada vez mais empregos, renda, divisas e desenvolvimento (BANCO DO BRASIL, 2004).

Graças ao saldo da balança comercial do agronegócio (US\$ 25,8 bilhões em 2003), o saldo total brasileiro foi positivo em US\$ 24,8 bilhões. A produção brasileira de grãos vem batendo sucessivos recordes devido ao incremento das produtividades médias obtidas. Apesar da séria crise por que passa a agricultura brasileira, dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) apontaram que a produção nacional de grãos terá um aumento de 5,3% (119,9 milhões de toneladas na safra 2005/06) em comparação com a safra anterior (113,9 milhões/t). A produtividade foi o principal fator para a manutenção desse crescimento, favorecido especialmente pelas lavouras de milho, algodão e arroz (CONAB, 2006).

Devido a essas safras, o Brasil atraiu grandes empresas internacionais que contribuíram para melhoria da produtividade da agroindústria, em função do aumento da competitividade, até aos padrões internacionais. Em 2003, o Brasil já era o maior exportador mundial de café, fumo, suco de laranja, açúcar, álcool entre outros produtos. Também, além de ser um dos maiores vendedores, detinha 38% do mercado de soja-grão e 44% do de café solúvel (BANCO DO BRASIL, 2004). Investimentos em pesquisas e tecnologias tornaram a soja e outros produtos brasileiros os mais competitivos do mundo.

A transformação da agricultura brasileira aconteceu a partir de meados da década de 1960, quando se iniciou o processo de modernização e desenvolvimento do País por meio do Plano de Metas introduzido pelo Governo de Juscelino Kubitschek.

Inicialmente, foi nas regiões do sul e sudeste do país que a agricultura se desenvolveu de forma intensiva. Entretanto, devido ao esgotamento de terras disponíveis para a ocupação da agropecuária, e a necessidade de aumento da produtividade agrícola, houve o direcionamento da produção para novas áreas e a conseqüente expansão.

Nesse contexto, a região dos Cerrados tornou-se estratégica na incorporação de novas áreas, tanto pela sua posição geográfica, como por suas características físico-ambientais, que propiciaram a expansão da produção agropecuária nos padrões da nova agricultura moderna.

O Cerrado constitui o segundo maior bioma brasileiro e da América do Sul ocupando mais de 2.000.000 km², o que equivale aproximadamente 22% do território brasileiro (IBGE, 2006) e espalha-se em várias unidades federativas: Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Piauí, Maranhão, Rondônia e Distrito Federal, ocorrendo também em áreas disjuntas da região Norte nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima. (AGUIAR & MONTEIRO, 2005). Esse Bioma é caracterizado por formas de vegetação com diferentes fitofisionomias, as quais apresentam camadas herbáceas formadas por gramíneas que recobrem o solo, com altura média de 50 cm, e/ou camadas arbóreas-arbustivas, com árvores espaçadas de médios e pequenos portes (SILVA, 2000). Além disso, ele é considerado o mais rico com relação à biodiversidade. Para alguns grupos, como as plantas, o nível de endemismo pode chegar a mais de 70% (FILGUEIRAS 2002, MACHADO *et al.*, 2004).

Dentre os 204 milhões de hectares, 151 milhões destes ainda podem ser explorados e cerca de 127 milhões têm potencial agrícola. No ano de 2000, a área utilizada era de apenas 47 milhões, sendo 35 milhões com pastagens cultivadas, 10 milhões com cultivos anuais e 2 milhões com culturas perenes e reflorestamentos.

Portanto, o Brasil possui cerca de 70 milhões de hectares agricultáveis, somente nos Cerrados, ainda por serem explorados (BANCO DO BRASIL, 2004; AGUIAR & MONTEIRO, 2005).

O modelo agrícola desenvolvido nos Cerrados, resultante da modernização, utiliza-se de muitos insumos agrícolas, sobretudo os agrotóxicos, para garantir uma alta eficiência no processo produtivo e retorno econômico. A adoção desse pacote tecnológico, chamado de “Revolução Verde”, que inclui o uso de máquinas, equipamentos, fertilizantes, agrotóxicos, sementes e matrizes melhoradas, foi fator determinante na modernização e expansão do setor agropecuário no país. Os avanços das pesquisas nas áreas da química, da mecânica e da engenharia genética foram elementos fundamentais nesse processo. A adoção desse padrão tecnológico permitiu a implantação em larga escala de sistemas monoculturais, com emprego intensivo de fertilizantes para os solos e agrotóxicos para controle de fitoparasitas (AGUIAR & MONTEIRO, 2005). Segundo a CONAB, os agrotóxicos representam, na composição dos custos de produção, para a região Centro-Sul, cerca de 25,4% para o algodão, 10,4% para o arroz, 10,9% para o milho, 19,2% para a soja e 15,7% para o trigo (CONAB, 2006).

Dentre as patologias de plantas, as causadas por fungos são as mais danosas, especialmente nas culturas estratégicas que possuem um alto valor econômico. Neste contexto, grandes prejuízos na produção são ocasionados pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* causador da ramulose do algodoeiro (IAMAMOTO, 2003). Essa doença foi constatada pela primeira vez no município de Rancharia, SP, em 1936, e já se encontra disseminada praticamente por todas as regiões do país onde se cultiva o algodoeiro.

Atualmente, vem causando problemas sérios nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e em algumas localidades do Nordeste brasileiro (CIA & SALGADO, 1995; MONTEIRO, 2002).

A principal via de disseminação do fungo é a semente, na qual pode ser veiculado externamente, na forma de conídios, ou internamente, na forma de micélio dormente. O fungo pode ainda sobreviver de um ano para outro em solo contaminado. Veiculado pela semente ou presente no solo, o inóculo primário causa lesões parciais em algumas plantas que vão servir como fonte de inóculo secundário. Lesões secundárias ocorrem nas plantas adjacentes e o patógeno, propagando-se radialmente, forma reboleiras (CIA & SALGADO, 1995; MONTEIRO, 2002).

A ramulose pode se manifestar em plantas de qualquer idade, desenvolvendo-se de preferência nos tecidos jovens. Os sintomas diretos aparecem primeiramente nas folhas novas, tanto na haste principal como nas laterais, na forma de manchas necróticas (Fig 1), ligeiramente circulares quando situadas no limbo entre as nervuras, e alongadas no sentido longitudinal.



Figura 1: Antracnose provocada por *Colletotrichum* spp (folha) indicada pela seta branca. **Fonte:** <http://vtgcrec.ifas.ufl.edu> Acessado em 26/10/06.

O tecido necrosado tende a cair, formando perfurações. As lesões, principalmente das nervuras, acarretam o desenvolvimento desigual dos tecidos foliares, ocasionando o enrugamento da superfície do limbo. O fungo afeta o meristema apical provocando sua necrose, o que estimula o desenvolvimento dos brotos laterais que se transformam em “ramos extranumerários”, conferindo à planta um aspecto de superbrotamento ou envassouramento. Plantas doentes ficam com porte reduzido (PAIVA *et al.*, 2001).

Um outro problema enfrentado pelos agricultores é a infestação das plantações com fitonematóides de galha do gênero *Meloidogyne* spp (Fig. 2). Este gênero possui uma ampla disseminação e um alto poder de destruição, representando um grave problema para a agricultura mundial (DUFOUR *et al.* 2003).



Figura 2: Juvenil de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* (J₂). **Fonte:** Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I (LIMPP), Embrapa Cenargen

A meloidoginose (Fig 3), patogenia resultante da interação nematóide-raiz induz a diferenciação de focos celulares, provocando a formação de galhas radiculares, o que reduz severamente a produtividade e, em casos mais graves, podem levar a morte da planta. As perdas anuais provocadas por *Meloidogyne incognita* a culturas como algodão, café e cana-de-açúcar atingem patamares de US\$ 4,1 bilhões, US\$ 2,6 bilhões e US\$ 16,5 bilhões, respectivamente (DUFOUR *et al.*, 2003).



Figura 3: Galhas radiculares (indicadas pelas setas brancas) provocadas pelo fitonematóide do gênero *Meloidogyne* spp.
Fonte: Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga I (LIMPP), Embrapa Cenargen

As estratégias mais utilizadas no controle de nematóides têm sido o uso de variedades resistentes, rotação de culturas, plantas antagonistas e nematicidas sintéticos (INSUNZA *et al.*, 2001; CHITWOOD, 2002; AMARAL *et al.*, 2002; DUFOUR *et al.*, 2003).

A utilização de variedades resistentes é uma maneira natural e recomendável de controlar pragas e doenças. Porém, no caso específico de fitonematóides, são poucas as variedades resistentes disponíveis para o agricultor e, mesmo assim, a resistência geralmente é direcionada a poucas espécies de nematóides considerados mais relevantes para certas culturas (FERRAZ & FREITAS, 2000; DUFOUR *et al.*, 2003).

Uma alternativa que tem se mostrado atrativa está relacionada ao uso de plantas antagonistas em esquemas de rotação ou plantio consorciado. Embora esta estratégia propicie benefícios como a diminuição de pragas e doenças, normalmente os produtores se decepcionam com os gastos extras, que reduzem significativamente os lucros esperados, e com a falta de aumento de produção. Devido a esses gastos extras, os agricultores preferem a utilização de químicos sintéticos (defensivos agrícolas), pois são de fácil aplicação, além de existir uma grande variedade de produtos disponíveis atualmente no mercado. Com isso, os agricultores, geralmente, aplicam doses maiores que o recomendado. Essa má utilização dos defensivos agrícolas acaba por contaminar o meio ambiente e animais (FERRAZ & FREITAS, 2000; AMARAL *et al.*, 2002; DUFOUR *et al.*, 2003).

Tanto para a ramulose quanto para a meloidoginose, o controle, atualmente, depende de fungicidas e nematicidas sintéticos, respectivamente. Esses químicos causam grandes riscos ao meio ambiente, como contaminações de solos e águas subterrâneas, danos a saúde humana e animal, a organismos não alvos e casos comprovados de desenvolvimento de organismos resistentes. Além disso, vem ocorrendo uma crescente pressão sobre as grandes redes de varejo para a oferta de produtos que sejam mais seguros tanto aos consumidores quanto ao meio ambiente (AGRIANUAL, 2001; TAMAI *et al.*, 2002). Esses problemas expressam claramente a importância e a necessidade de pesquisas para a busca de alternativas menos danosas ecologicamente, eficientes e mais específicas para o controle de fitopatógenos.

Neste contexto de busca de alternativas naturais, existem inúmeros trabalhos descritos na literatura sobre a utilização de extratos de plantas como fontes em potencial de compostos com propriedades antifúngicas e nematicidas e/ou nematostáticas, principalmente de folhas raízes e sementes (CHITWOOD, 2002; AMARAL & BARA, 2005 ROCHA *et al.*, 2006a). Esses efeitos têm sido relacionados à presença de peptídeos/proteínas

como, por exemplo, defensinas e lectinas (PELEGRINI *et al.*, 2006) e metabólitos secundários (MOLAN *et al.*, 2000, GUERREIRO *et al.*, 2005, DINIZ *et al.*, 2006).

Defensinas são proteínas de baixo peso molecular que provavelmente estão relacionadas com a inibição do crescimento de fungos por meio de uma interação direta com os esfingolípídios da superfície da membrana da célula (PELEGRINI *et al.*, 2005). Outra família de proteínas conhecidas como proteínas de transferência lipídica (LTP), também com baixo peso molecular e extremamente estabilizada por quatro pontes dissulfeto, exercem efeitos de inibição no crescimento fúngico provavelmente por agirem no tráfico de fosfolípídios que atravessam as membranas (CAMMUE *et al.*, 1995, PELEGRINI *et al.*, 2006).

As lectinas são amplamente encontradas na natureza, especialmente em leguminosas. Essas são glicoproteínas que se ligam reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico (MARBAN-MENDONZA *et al.*, 1992). Vários papéis biológicos são atribuídos as lectinas, dentre eles atividades inseticidas, fungicidas e nematocidas. Essas proteínas têm sido associadas ao bloqueio de quimiorreceptores de nematóides, o qual dificulta a mobilidade e à localização da planta por parte do parasita (SILVA *et al.*, 2002).

As plantas são fontes de um amplo espectro de mais de 100.000 produtos naturais de baixo peso molecular, conhecidos como substâncias vegetais ou metabólitos secundários (DIXON, 2001; COELHO *et al.*, 2006). Nos vegetais, estes compostos podem estar associados à diferenciação celular, regulação do crescimento, à mediação das interações entre plantas e outros organismos e, principalmente, proteção (VERPOORTE e MEMELINK, 2002, TAIZ & ZEIGER, 2004).

Dentre os metabólitos secundários, destacam-se os polietilenos encontrados em Tagetes, isotiocianatos e glicosinolatos oriundos de Brassica e outros compostos isolados de diferentes famílias vegetais, como glicosídeos cianogênicos, poliacetilenos, alcalóides, compostos fenólicos entre outros (VERPOORTE e MEMELINK, 2002; TAIZ & ZIEGER, 2004; DIXON, 2005).

Adicionalmente, extratos vegetais possibilitam, por exemplo, a obtenção de novos produtos, os quais as pestes ainda não podem inativar, são rapidamente biodegradados além de apresentar vários modos de ação, tornando possível um vasto espectro de uso enquanto retém uma ação seletiva dentro de cada classe de peste, e por fim, são derivados de recursos renováveis, diferentemente dos materiais sintéticos (FERRAZ & FREITAS, 2000).

Utilizando extratos vegetais, vários trabalhos demonstraram que espécies da família Meliaceae são fontes importantes de metabólitos secundários com diversas propriedades, dentre elas bactericida (NAGALAKSHMI *et al.*, 2003), inseticida (GONÇALVES-GERVÁSIO & VENDRAMIM, 2004) e fungicida (HASIMOTO E SOUZA *et al.*, 2002). Estudos preliminares utilizando plantas desta família do gênero *Guarea* spp., provenientes do Bioma Cerrado, demonstraram resultados motivadores. As espécies *Guarea kunthiana* A. Juss e *Guarea guidonea* (L) Sleumet mostraram ser fortes candidatos para o controle de protozoários causadores de doenças tropicais como, por exemplo, a Leishmaniose (MESQUITA *et al.*, 2005).

Pesquisas em andamento na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia no Laboratório de Interação Planta-Praga I (LMPP), demonstraram resultados inovadores, como atividade nematocida específica, de uma substância vegetal extraída de uma espécie da família Leguminosae. Sendo assim, a busca de substâncias vegetais com atividade específica sobre fitoparasitas é fortemente estimulada, principalmente de espécies da família Meliaceae, uma vez que os extratos dessa família constituem fontes notáveis de moléculas bioativas (HASIMOTO E SOUZA *et al.*, 2002; DUFOUR *et al.* 2003; COELHO *et al.*, 2006).

HIPÓTESE

O Bioma Cerrado possui plantas como fontes de metabólitos secundários e proteínas e/ou peptídeos com propriedades antifúngicas e nematicidas/nematostáticas em potencial como novos defensivos agrícolas naturais.

JUSTIFICATIVA

As metodologias descritas atualmente para o controle de fitoparasitas são várias, dentre elas estão a rotação de culturas, o uso de variedades resistentes, a utilização de plantas antagonistas e o controle biológico (DUFOUR *et al.*, 2003; AMARAL *et al.*, 2002; INSUNZA *et al.*, 2001; FERRAZ & FREITAS, 2000). Apesar das diversas possibilidades em termos estratégicos, atualmente o controle de fitoparasitas está centrado principalmente no uso de nematicidas.

No Brasil, o controle de pragas e doenças de plantações cultivadas em campo aberto é feito quase exclusivamente com produtos químicos sintéticos. Este fato ocorre devido à tradição do uso desses produtos junto aos produtores, facilidade de aplicação e disponibilidade de equipamentos e serviços no mercado (TAMAI *et al.*, 2002).

A utilização de químicos sintéticos para controlar doenças causadas por fitopatógenos acarreta riscos ao meio ambiente como, contaminações de solos e aquíferos, danos à saúde humana e a organismos não alvos, além de casos comprovados de desenvolvimento de resistência e elevados custos (FERRAZ & FREITAS, 2000; AGRIANUAL, 2001; DIXON, 2001; TAMAI *et al.*, 2002; DUFOUR *et al.*, 2003).

Dessa forma, a necessidade de se encontrar outras alternativas viáveis e eficientes por meio de pesquisas para o controle de fungos fitopatogênicos e fitonematóides torna-se importante.

Os estudos fitoquímicos confirmaram que extratos de muitas plantas são fontes potenciais de metabólitos secundários (COELHO *et al.*, 2006). Além disso, extratos vegetais provenientes da família Meliaceae demonstraram ser fortes candidatos com atividades específicas que podem ser usadas para a obtenção de novos produtos para o controle de patologias vegetais causadas por fitoparasitas (HASIMOTO E SOUZA *et al.*, 2002; ADEKUNLE *et al.*, 2003; GONÇALVES-GERVÁSIO & VENDRAMIM, 2004).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a atividade de extratos de diferentes partes de plantas da família Meliaceae com efeito nematicida e fungicida.

Objetivos Específicos

- Testar extratos de raiz, caule, folha e fruto de *Guarea kunthiana* e *Guarea guidonea* contra *C. gossypii*.
- Testar extratos de raiz, caule, folha e fruto de *Guarea kunthiana* e *Guarea guidonea* contra Juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*;

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Plantas

Os extratos das plantas pertencentes à família Meliaceae foram gentilmente cedidos pela Dr^a Laila Salmen Espíndola, coordenadora do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília (UnB), e mantidas em freezer a -80°C.

Fungo

O fungo *Colletotrichum gossypii* var. cephalosporioides foi gentilmente cedido pelo Dr. Nelson Dias Suassuna da Embrapa Algodão Campina Grande – PB. Os esporos foram mantidos em microtubos de 1,5 mL contendo sílica e armazenados na câmara fria a 4°C do Cenargen.

Nematóides

A manutenção de coleções de nematóides constitui um trabalho rotineiro na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) com três meses são infestadas com 10.000 Juvenis de segundo estágio (J₂) e cultivadas em casa-de-vegetação por três meses do Cenargen.

Extração e obtenção do material biológico

Extratos

Foram utilizadas duas espécies de *Guarea* spp. pertencentes à família Meliaceae: *Guarea. Kunthiana* A. Juss e *Guarea. Guidonea* (L) Sleumet. No quadro 1 está a relação das partes vegetais utilizadas de ambas as espécies e o respectivo solvente utilizado para extração. Os números entre parênteses e os asteriscos se referem aos extratos utilizados nos bioensaios contra *C. gossypii* e *M. incognita*, respectivamente.

Quadro 1: Relação das partes vegetais utilizadas de cada espécie de *Guarea* spp. Os números e os asteriscos se referem aos extratos utilizados nos bioensaios contra *C. gossypii* e *M. incognita*, respectivamente. (M+C corresponde a Madeira+Casca).

Espécie	Parte vegetal	Solvente
<i>G. Kunthiana</i> A. Juss* (1)	Fruto	Hexano
<i>G. Kunthiana</i> A. Juss* (2)	Fruto	Etanol
<i>G. Kunthiana</i> A. Juss* (3)	Folha	Hexano
<i>G. Kunthiana</i> A. Juss* (4)	Folha	Etanol
<i>G. Kunthiana</i> A. Juss* (5)	Caule (M+C)	Etanol
<i>G. Kunthiana</i> A. Juss*	Caule (M+C)	Hexano
<i>G. Guidonea</i> (L) Sleumet* (6)	Raiz (M+C)	Hexano
<i>G. Guidonea</i> (L) Sleumet* (7)	Raiz (M+C)	Etanol
<i>G. Guidonea</i> (L) Sleumet* (8)	Caule (M+C)	Etanol
<i>G. Guidonea</i> (L) Sleumet* (9)	Caule (M+C)	Hexano
<i>G. Guidonea</i> (L) Sleumet* (10)	Folha	Etanol
<i>G. Guidonea</i> (L) Sleumet*	Folha	Hexano
<i>G. Kunthiana</i> A. Juss* (11)	Raiz (M+C)	Hexano
<i>G. Kunthiana</i> A. Juss* (12)	Raiz (M+C)	Diclorometano
<i>G. Kunthiana</i> A. Juss* (13)	Caule (M+C)	Diclorometano

As partes vegetais foram separadas, dessecadas e a extração dos compostos foi feita a partir da pulverização do material e maceração em diferentes solventes (hexano, diclorometano e etanol) durante uma semana. Em

seguida as amostras foram filtradas, os solventes retirados por evaporação rotativa, o material foi concentrado pela mesma técnica e estocado a -20°C. As amostras foram ressuspensas utilizando o solvente orgânico Dimetil Sulfóxido (DMSO) na concentração de 100% para a realização dos bioensaios.

Obtenção de Juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*

As plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) previamente infectadas durante três meses com os Juvenis de segundo estágio de *M. incognita* foram selecionadas. Para a obtenção dos ovos, as raízes dessas plantas tiveram suas galhas seccionadas e trituradas em um liquidificador contendo uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, de acordo com a metodologia desenvolvida por HUSSEY & BARKER, (1973). A suspensão contendo os ovos de *M. incognita* foi submetida a técnica de funil de Baermann modificada para a obtenção J₂. Em seguida, esta suspensão foi colocada em uma câmara de eclosão e, após 48 horas, os J₂ foram contados utilizando lâmina de Peters e microscópio ótico.

Germinação dos esporos de *Colletotrichum gossypii*

Os esporos de *C. gossypii* foram colocados sobre o meio Batata Dextrose Agar (BDA) Difco em placas de Petri de 90mm x 15mm e incubadas à 28°C por 24 horas.

Ensaio biológicos

Teste *in Vitro* da atividade dos extratos sobre *C. gossypii*

A inibição do crescimento da hifa foi feita transferindo o fungo crescido para uma nova placa de Petri com meio BDA e utilizando discos de papel estéreis contendo alíquotas de 200µg.µl⁻¹ de cada extrato. Os ensaios foram realizados em duplicata e foi utilizado como controle negativo DMSO 100% e controle positivo Nistatina 2000UI. A medição do halo foi feita utilizando uma régua milimetrada todos os dias durante uma semana.

Testes *in Vitro* da atividade dos extratos sobre *M. incognita*

Para avaliar o efeito dos extratos sobre a mortalidade dos nematóides, foram utilizadas alíquotas contendo 1mg de cada extrato para uma suspensão de J2 na proporção de 100 J2.mL⁻¹, ajustando o volume final para 1ml por placa de cultura de tecido. As placas foram mantidas a 26°C e, após 24hrs, os J2 mortos e vivos foram contados com o auxílio de lâmina de Peters e microscópio ótico. Os ensaios foram realizados em duplicata tendo como controle positivo água destilada e controle negativo DMSO a 1,5%.

A mortalidade dos J2 foi certificada centrifugando a solução dos nematóides a 4000 rpm por 10 minutos, transferindo os Juvenis tratados, aparentemente mortos, para uma placa de Cultura de Tecido contendo 1mL de água destilada e examinando-os após um período de 10 horas.

Os dados foram analisados com o auxílio do programa Windows Excel.

Análise de dados

Foram aplicadas análises estatísticas descritivas tais como média e desvio padrão com o auxílio do programa Windows Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio biológico para avaliar a atividade dos extratos sobre o crescimento do fungo *C. gossypii*

Dos 13 extratos utilizados para este ensaio, nas condições e concentrações estipuladas, nenhum foi capaz de inibir o crescimento do fungo causador da ramulose. Os extratos se apresentaram semelhantes ao controle negativo (Figura 4 A-D).

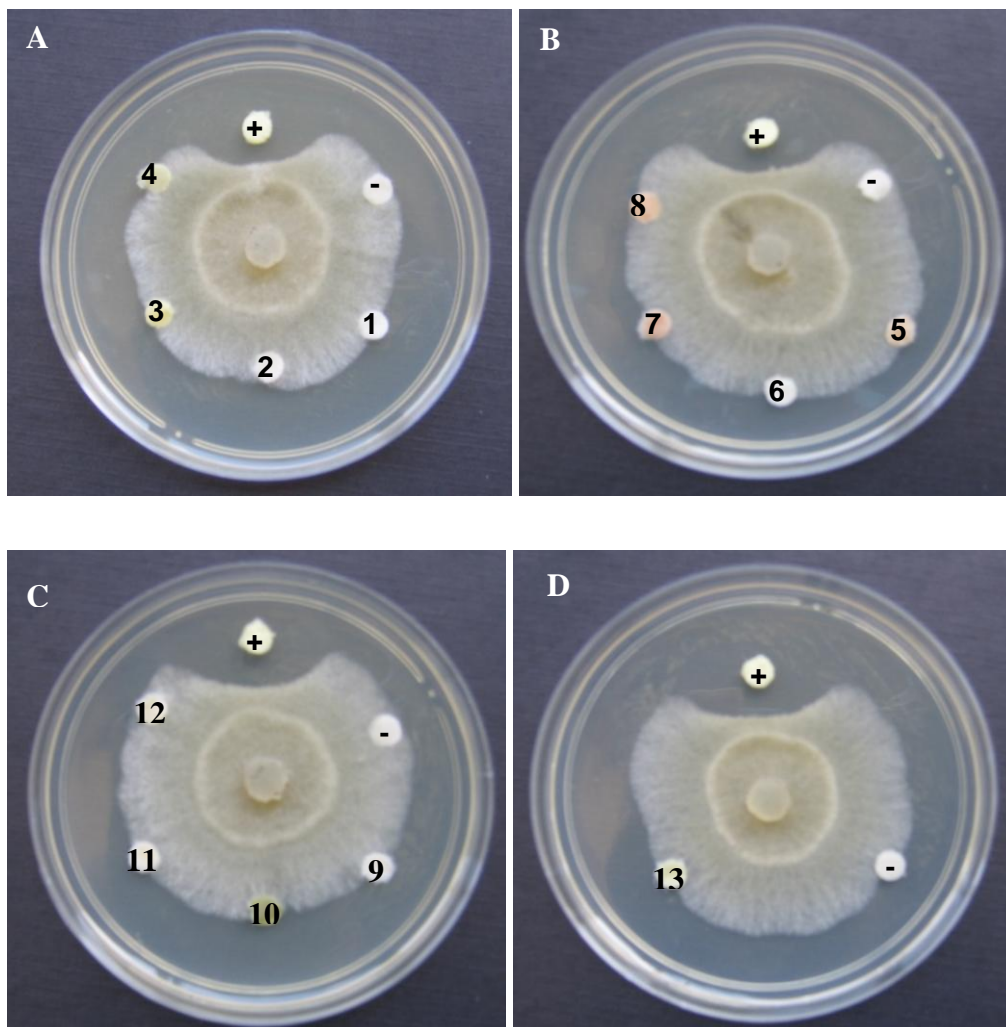


Figura 4 A-D: Bioensaio utilizando extratos da família Meliaceae sobre *Colletotrichum gossypii* var. cephalosporioides. De acordo com os resultados, os extratos apresentaram semelhantes ao controle negativo, indicando que os mesmos não possuem efeitos fungicidas para a concentração de $200\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. + (controle positivo), - (controle negativo), 1-13 (extratos).

A razão pela qual não se observou efeito fungicida dos extratos pode estar relacionado à concentração utilizada ($200\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$). De acordo com estudos preliminares para qualquer composto testado, valores acima de $200\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ faz com que o material em questão não seja eficiente para ser um produto novo e diferente dos atuais no mercado (PELEGRINI *et al.*, 2006). É possível ainda que a triagem feita para as partes vegetais das duas espécies selecionou metabólitos ou proteínas que não apresentam atividade antifúngica.

Não existem relatos sobre o efeito fungicida das espécies em estudo contra a ramulose ou outros fungos fitopatogênicos. A escassez de estudos com relação a extratos de plantas do Bioma Cerrado é o principal fator.

Contudo, existem vários relatos na literatura sobre extratos vegetais da família Meliaceae, principalmente óleos essenciais, que são capazes de inibir crescimento de organismos, tanto patogênicos quanto fitopatogênicos. Nagalakshmi et al., (2003) constataram que os óleos essenciais de *Melia dubia* Cav e; *Chukrasia tabularis* Adr. Juss foram capazes de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris* e *Fusarium oxysporum*, causadores de infecções mais frequentes em humanos.

O óleo essencial de *Khaya ivorensis* demonstrou efeitos satisfatórios no controle de *Botrytis cinerea* Pers (ABDELGALEIL et al, 2005), fungo fitopatogênico causador da podridão cinzenta de várias culturas importantes para o Brasil, como algodão e soja. Adekunle et al., (2003) observaram que o extrato bruto da planta acima citada também foi capaz de inibir o crescimento de *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Candida albicans*, *Microsporum audonii*, *Trichoderma viride* e *Trichophyton mentagrophytes*.

Os extratos de algumas espécies, inclusive de plantas do Cerrado, demonstraram resultados motivadores. Vários autores constataram que plantas da família estudada neste trabalho possuem atividades contra moluscos (PEREZ et al., 1998), larvas de insetos (VINAUD et al., 2005), insetos (SOUZA E VENDRAMIN, 2001), protozoários (MESQUITA et al., 2005) bactérias e fungos patógenos de humanos (HASIMOTO E SOUZA et al., 2002).

Os resultados obtidos não confirmaram a hipótese da existência de metabólitos secundários ou proteínas das espécies *G. kunthiana* e *G. guidonea* com atividade antifúngica. Entretanto, como trabalhos futuros, novas triagens podem ser feitas e testadas para verificar atividade fungicida contra a ramulose do algodoeiro.

Ensaio biológico para avaliar a atividade dos extratos sobre *M. incógnita*

Os resultados obtidos nos bioensaios mostraram uma atividade sobre J₂ para o extrato de número 15, correspondente ao extrato do Caule (Madeira+Casca) da espécie *Guarea kunthiana* A. Juss, extraído com diclorometano. Neste, os nematóides se apresentaram totalmente paralisados indicando uma atividade nematostática.

Os demais extratos se mostraram semelhantes ao controle negativo (Fig 5).

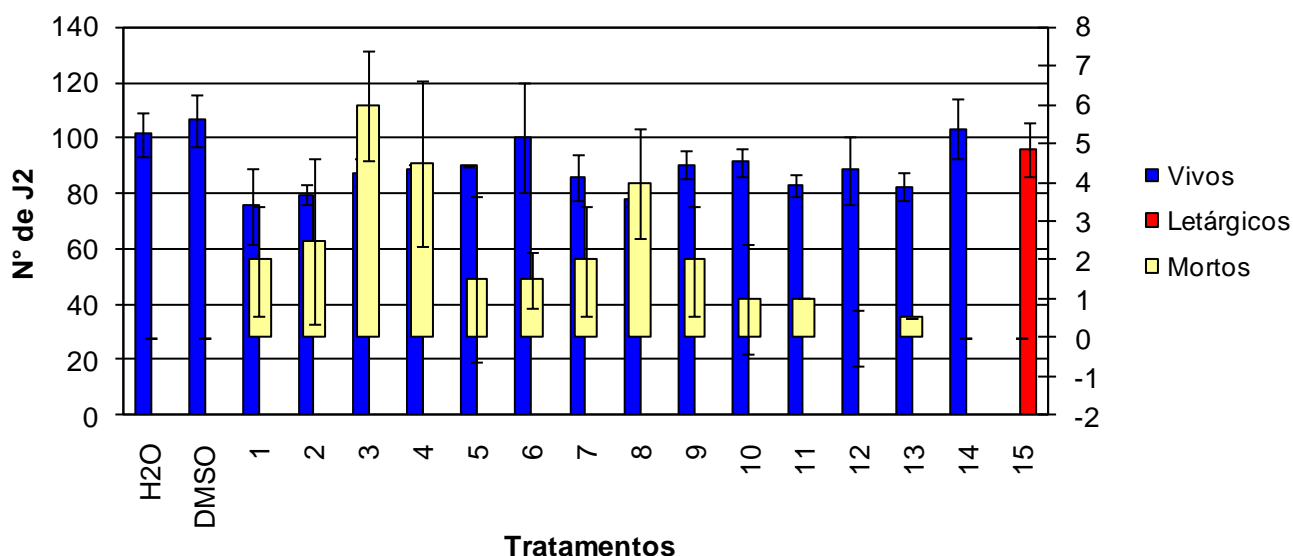


Figura 5: Efeito dos extratos de *G. kunthiana* e *G. guidonea* providas da família Meliaceae sobre os Juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*. Nota-se uma atividade para o extrato de número 15.

A presença da atividade no extrato de caule indica a existência de metabólicos primários e secundários em diferentes partes das plantas com atividade específica e não somente em raiz, como era esperado (HASIMOTO E SOUZA *et al.*, 2002; JOURAND *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2006).

Para o teste de validação do experimento e confirmação da mortalidade, efetuou-se o retorno dos nematóides para a água destilada, na qual eles recuperaram a mobilidade (Fig 6). Isto demonstra que o extrato não possui efeito nematicida, e sim um efeito nematostático.

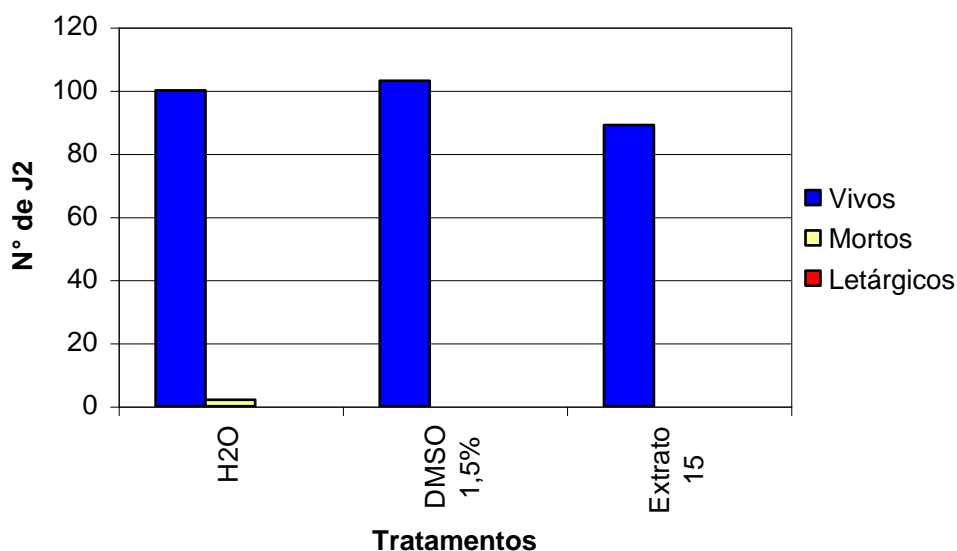


Figura 6: Teste de validação e confirmação do tipo de atividade do extrato de número 15 sobre os Juvenis de segundo estágio (J₂), no qual foi demonstrado que o efeito é nematostático.

Assim como para a ramulose, são poucos os estudos acerca dos efeitos dos extratos da família Meliaceae sobre os Juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*. Ferraz & Freitas (2000) relataram que um bom

controle para *M. incognita* foi conseguido mergulhando as raízes de tomateiros em extratos de plantas como *Azadirachta indica* e *Melia azedarach*, ambas pertencentes à família Meliaceae, não nativas do Cerrado.

O fato de existirem plantas da família citada acima que demonstraram bons resultados no controle de nematóides é um ótimo indicativo da existência de possíveis candidatos para controle de fitonematóide utilizando extratos de plantas do Cerrado, um Bioma pouco estudado e com vários representantes desta família (MACHADO *et al.*, 2004, HASIMOTO E SOUZA *et al.*, 2002).

Adicionalmente, existem muitos trabalhos relatando o efeito nematicida ou nematostático de extratos de várias partes das plantas de famílias como Leguminosae (FERRAZ & FREITAS, 2000; SILVA *et al.*, 2002; DEMUNER *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2006), Asteraceae (CHITWOOD, 2002), Fabaceae (JOURAND *et al.*, 2004), dentre outras. Normalmente, esta atividade está relacionada à presença de compostos como metabólitos secundários, peptídeos ou proteínas com atividades específicas (CHITWOOD, 2002; SILVA *et al.*, 2002; DEMUNER *et al.*, 2003;).

Os metabólitos secundários são mais comuns em plantas e fungos e podem atuar como componentes estruturais, defesas contra herbívoros e patógenos, (TAIZ & ZIEGER, 2004). Na literatura são descritos vários tipos de metabólitos secundários com a capacidade de controlar fitonematóides. Trabalhos fitoquímicos confirmaram que extratos de muitas plantas são fontes potenciais de metabólitos secundários, que são nematicidas constituídos principalmente por alcalóides, terpenos, taninos, flavanóides e glicosídeos dentre outros (GONÇALVES-GERVÁSIO & VENDRAMIM, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2004; GUERREIRO *et al.*, 2005).

CHITWOOD (2002) cita, em sua revisão, diferentes tipos de metabólitos secundários extraídos de várias plantas, dentre elas, polietilenos em cravo-de-defunto (*Tagetes* spp), alcalóides em *Crotalaria spectabilis*, uma planta bastante conhecida e utilizada pela população no combate a formigas e triterpenóides de *Azadirachta indica*, mas comumente conhecida como nim.

Os efeitos das lectinas (glicoproteínas) são bastante descritos na literatura (CARLINI E GROSSI-DE-SÁ, 2002; SILVA *et al.*, 2002). Zuckerman (1983) constatou inicialmente que as lectinas bloqueiam as reações do sistema quimiorreceptor de nematóides, o que altera o quimiotropismo e, conseqüentemente, a mobilidade e a localização da planta pelo fitonematóide. Para verificar essa possível ação do extrato de *G. kunthiana*, seria necessário a re-inoculação destes nematóides tratados com o extrato em tomateiros e verificar a formação de galhas radiculares após um período de três meses.

Apesar do grande número de trabalhos publicados indicando a atividade de diversos extratos, pouco se sabe a respeito das moléculas atuantes, muito menos sobre o mecanismo de ação delas. A presença de compostos com atividade em extratos de plantas, especialmente dentro da família Meliaceae, evidencia a importância dos estudos na área de prospecção de possíveis moléculas ativas contra *M. incognita*.

Até a conclusão deste trabalho, o tipo de molécula ativa responsável pela paralisação dos nematóides (protéico ou composto secundário) não foi identificado. Todavia, estes resultados confirmam a hipótese de que plantas nativas do Cerrado da espécie *G. kunthiana*, pertencente à família Meliaceae, tem atividade nematicida ou nematostática. Como trabalhos futuros, assim como para a ramulose, novas triagens podem ser feitas para averiguar possíveis atividades sobre os Juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*.

CONCLUSÃO

- Os treze extratos das plantas *G. kunthiana* e *G. guidonea* não possuem atividades antifúngicas para *Colletotrichum gossypii*;
- Dos quinze extratos testados, somente um apresentou atividade sobre os Juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*; este corresponde ao extrato de *G. kunthiana*, Caule (M+C) extraído com diclorometano;
- O extrato de *G. kunthiana* pode ser um candidato em potencial de metabólitos secundários ou proteínas para um novo defensivo agrícola.

PERSPECTIVAS

Informações acerca da natureza bioquímica e estrutural das moléculas com atividade nematostática, obtidas do extrato de caule (M+C) da espécie *G. kunthiana*, permitirão o entendimento dos mecanismos efetivos sobre os fitoparasitas. Portanto, as próximas etapas deste trabalho consistem em testar o nível de citotoxicidade do extrato ativo, assim como testes de termoestabilidade; iniciar processos de purificação por meio de diálises seguidas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC); testar a especificidade da molécula. Fazer triagens de novas plantas da família Meliaceae e continuar a construção do banco de moléculas defensivos agrícolas no LIMPP.

Estes resultados contribuirão para o enriquecimento do conhecimento científico brasileiro aplicável, assim como para o conhecimento acerca das espécies nativas do Bioma Cerrado.

REFERÊNCIAS

- ABDELGALEIL, S.A.M; HASHINAGA, F., NAKATANI, M. 2005. Antifungal activity of limonoids from *Khaya ivorensis*. **Pest Management Science**, v: 61, n. 2, p. 186-190.
- ADEKUNLE, A.A., DURU, C., ODUFUWA, O.M. 2003. [Antifungal activity and phytochemical screening of the crude extracts of *Khaya ivorensis* Juss \(Meliaceae\) and *Tetracera potatoria* L. \(Dilleniaceae\)](#). **South African Journal of Botany**, v. 69 n° 4, p 568-571.
- AGRIANUAL. Anuário da agricultura brasileira: 2001. São Paulo: FNP Consultoria & Comercio, 545p.
- AGUIAR, T. de J. A. de & MONTEIRO, M. do S. L. 2005. Modelo Agrícola e desenvolvimento Sustentável: A ocupação do Cerrado piauiense. **Ambiente & Sociedade**, v. VIII, nº. 2.
- AMARAL, D.R.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P.; CARVALHO, D.A. 2002. Efeitos de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, v. 26, nº 1, p. 43-48,
- AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. 2005. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia** Suplemento, v 2, nº 2, p. 5- 8.
- BANCO DO BRASIL. (BRASIL). 2004. Diretoria de Agronegócio. O agronegócio brasileiro. Desempenho, mercados e potencialidades. **Revista Política Agrícola**, Ano XIII - nº 4 – p. 4-9.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB (BRASIL). <http://www.conab.gov.br> Acessado em 13/07/2006.
- IBGE, RESERVA ECOLÓGICA DO (BRASIL). <http://www.recor.org.br/cerrado/cerrado.html> Acessado em 14/09/06.
- CAMMUE, B.P.; THEVISSEN, K.; HENDRIKS, M.; EGGERMONT, K.; GODERIS, I.J.; PROOST, I.; VAN DAMME, J.; OSBORN, R.W.; GUERBETTE, F.; KADER, J.C. 1995. A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins, **Plant Physiol**, v 109, p. 445–455.
- CARLINI, C. R. e GROSSI-DE-SÁ, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p.1515–1539.
- CHITWOOD, D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annu. Rev. Phytopathol**, v 40, p. 221-249.

- CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium spp.*). In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, Doenças das Plantas Cultivadas, v 2, p. 331-341, 1995.
- COELHO, A. A.M.; DE PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA L.S. 2006. Insecticidal Activity of Cerrado Plant Extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under Laboratory Conditions. *Neotropical Entomology*, v. 35, p. 133-138.
- DEMUNER, A. J., BARBOSA, L. C. de A., NASCIMENTO, J. C. do, VIEIRA, J. J. 2003. Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. **Quim. Nova**, v. 26, nº 3, p. 335-339.
- DINIZ, L. P., MAFFIA, L. A., DHINGRA, O. D. *et al.* 2006. Quantification of the efficacy of alternative products for tomato late blight control. **Fitopatol. bras.**, v.31, nº.2, p.171-179.
- DIXON, R. A. 2001. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v.411, p.843–847.
- DIXON, R. A. 2005. Engineering natural product pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, nº 3, p.329–336.
- DUFOUR, R., GUERRERA M., EARLES, R. 2003. Appropriate Technology Transfer for Rural Areas. **Alternative Nematode Control**, Disponível em: www.attra.ncat.org. Acessado em: 06 de junho de 2006.
- FERRAZ, S. & FREITAS, L. G. 2000. O Controle de Fitonematóides por Plantas Antagonistas e Produtos Naturais. Sociedade Brasileira de Nematologia. Disponível em: www.ciagri.usp.br/~sbn, Acessado em 14 de Junho de 2004.
- FILGUEIRAS, T.S. Herbaceous plant communities. In: **The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna**. P.S. Oliveira e R.J. Marquis (eds). Columbia University Press, New York, EUA, 122-139 p. 2002.
- GONÇALVES-GERVÁSIO, R. de C. R. & VENDRAMIM, J. D. 2004. Modo de ação de extratos de meliáceas sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 71, nº 2, p.215-220.
- GUERREIRO, G. *et al.* 2005. Sesquiterpenes from the stem of *Pilocarpus riedelianus* and antimicrobial activity. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, nº 6, p.986-990.
- HASIMOTO E SOUZA, L. K.; OLIVEIRA, C. M. A. de; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G. de; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. do R. R. 2002. Antifungal properties of Brazilian Cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33 p. 247-249.

- HUSSEY, R.S. & BARKER, A.A. 1973. Comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p. 1025-1028.
- IAMAMOTO, M. M. Doenças foliares do algodoeiro. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia - FUNEP, Jaboticabal. 2003.
- INSUNZA, V., ABALLAY, E., MACAYA, J. 2001. Nematicidal Activity of Aqueous Plant Extract on *Xiphinema* index. **Nematol. Medit**, v 29, p. 35-40.
- JOURAND, P., RAPOIR, S., FARGETTE, M. e MATEILLE, T. 2004. Nematostatic activity aqueous extracts of West African *Crotalaria* species. **Nematology**, v. 6, n° 5, p. 765-771.
- MACHADO, R.B., M.B. RAMOS NETO, P.G.P. PEREIRA, E.F. CALDAS, D.A. GONÇALVES, N.S. SANTOS, K. TABOR E M. STEININGER. 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.
- MARBAN-MENDONZA, N.; DICKLOW, M.B.; ZUCKERMAN, B.M. 1992. Control of *Meloidogyne incognita* on tomato by two leguminous plants. **Fundamental and Applied Nematology**, v 15, p.87-108.
- MESQUITA, M. L. de; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E. de; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. 2005. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n° 7, p.783-787.
- MOLAN, A.L.; ALEXANDER, R.; BROOKAS, I.M.; MCNABB, W.C. 2000. Effects of sulla condensed tannins on the viability of three sheep gastrointestinal nematodes. **NZSAP**, v 60, p.21-25.
- MONTEIRO, J. E. B. de A. **Microclima e ocorrência de ramulose no algodoeiro em diferentes densidades populacionais**. 2002. (Dissertação) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11131/tde-12032003-145/50/> Acessado em 22/03/07.
- NAGALAKSHMI, M. A. H.; THANGADURAI, D.; PULLAIAH, T. 2003. In vitro antimicrobial efficacy of leaf essential oils of *Chukrasia tabularis* Adr. Juss. and *Melia dubia* Cav. (Meliaceae). **Phytotherapy Research**, v. 17, n° 4, p: 1099-1573.
- PAIVA, F.A.; ASMUS, G.L.; ARAÚJO, A.E. Doenças In: Embrapa Agropecuária Oeste. **Algodão: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2001. p. 245-272.
- PELEGRINI, P.B.; NORONHA, E.F.; MUNIZ, M.A.R.; VASCONCELOS, I.M.; CHIARELLO, M.D.; OLIVEIRA, J.T.A.; FRANCO, O.L. 2006. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S-albumin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1764, n° 6, p. 1141-1146.

- PELEGRINI, P.B., FRANCO, O.L. 2005. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins, **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v 37, p. 2239–2253.
- PEREZ, M.P., FERNANDEZ, L.D., GUIRADO, O.A.A., CAPOTE, R.V., AGUILAR, G.G. 1998. Actividad molusquicida del Paraíso (*Melia azedarach* L.) (Meliaceae) sobre *Lymnaea cubensis*, molusco vector de Fasciolosis. **Rev. Saúde Pública**, v. 32, nº 3, São Paulo.
- ROCHA, T. L.; MURAD, A. M.; EVARISTO, R. G. de S.; ALMEIDA, W. da S.; MAGALHÃES, J. C. C.; MATTAR, M. C. da S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. 2006a. Efeito Nematicida de Extratos Aquosos de Sementes de Plantas sobre Juvenis de Segundo Estádio de *Meloidogyne incognita*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- ROCHA, T. L.; EVARISTO, R. G. de S.; SILVA, L. P. da; LIMA e SOUZA, D. dos S. de; MARRA, B. M.; COSTA, P. H. A. da; MAGALHÃES, J. C. C.; MATTAR, M. C. da S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.. 2006b. Metabolômica: aplicações e perspectivas. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- SILVA, L.L. O papel do Estado no processo de ocupação das áreas de Cerrado entre as décadas de 60 e 80. 2000. **Revista Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 1, nº. 2, p. 24-36.
- SILVA, G. S., SOUZA, I. M. R. & CUTRIM, F. A. 2002. Efeito da incorporação de sementes trituradas de Feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. **Fitopatologia brasileira**. v. 27, nº 4.
- SOUZA, A. P. de e VENDRAMIM, J. D. 2001. Atividade Inseticida de Extratos Aquosos de Meliáceas sobre a Mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, nº1, p. 133-137.
- TAMAI, M. A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; FAION, M.; PADULLA, L. F. L. 2002. Toxicidade de produtos fitossanitários para *beauveria bassiana* (bals.) vuill. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, nº 3, p. 89-96.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A. p. 309-344, 2004.
- VERPOORTE, R. e MEMELINK, J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13 nº 2, p.181–187.
- VINAUD, M. C.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H; LINO JUNIOR, R. de S.; BEZERRA, J. C. B. 2005. Avaliação da atividade larvívica de plantas fitoterápicas do cerrado do gênero *Stryphnodendron* spp. sobre miracídios e cercárias de Schistosoma. **Rev. Patol. Trop**, v. 34, nº 2, p. 137-143.

ZUCKERMAN, B.M. 1983. Hypotheses and possibilities of intervention in nematode chemoresponses. **Journal of Nematology**, v. 15, p.173-182.